

ลิษา จัน : การผลิตกรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย จากเชื้อ *ESCHERICHIA COLI* ที่ดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย (PRODUCTION OF SUCCINIC ACID FROM SUCROSE AND SUGARCANE MOLASSES BY METABOLIC ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันตะมา, 90 หน้า.

เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล สายพันธุ์ KJ122 ได้ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตซักซินิกใน ระดับความเข้มข้น และ ผลได้ที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีกลูโคส ภายใต้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการยับยั้งกระบวนการสลาย ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครสของสายพันธุ์ KJ122 ยีนที่สร้างเอนไซม์สลายซูโครส (*cscA* and *cscKB*) ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของเชื้ออีโคไลสายพันธุ์ B ซึ่งความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ตามธรรมชาติถูกโคลนและแสดงออกในอีโคไลสายพันธุ์ KJ122 โดยที่สายพันธุ์ KJ122 ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pKJSUC อยู่จะถูกคัดเลือกการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Phenol Red ที่มีน้ำตาลซูโครสผสมอยู่ทั้งอาหาร เลี้ยงเชื้อแบบเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารวุ้น โคลนที่ได้สามารถแสดงอาณาเขตโคโลนีสีเหลือง สีที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ KJ122 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น และยังสามารถแสดงความสามารถในการเจริญ และการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในอาหาร เลี้ยงเชื้อแบบเหลว หลังจากการทำวิวัฒนาการของกระบวนการสร้างและสลาย สายพันธุ์ KJ122-pKJSUC สามารถใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดซักซินิก ที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อื่นไม่พึงประสงค์ ในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ AM1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ที่ 70 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสให้กรดซักซินิกที่ความเข้มข้น  $50.52 \pm 1.8$  กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 1.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และที่ความเข้มข้น  $46.59 \pm 1.23$  กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ภายในเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่ายาปฏิชีวนะไม่มีผลกระทบต่อการผลิต กรดซักซินิก จากเชื้อสายพันธุ์ KJ122-pKJSUC ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ นอกจากนั้นกรดซักซินิกถูกผลิตที่ความเข้มข้น  $47.69 \pm 3.94$  กรัมต่อลิตร (ผลิตผล 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากกากน้ำตาลอ้อย 150 กรัมต่อลิตร ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ในเวลา 48 ชั่วโมง จากการเพิ่มขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรพบว่ากรดซักซินิกถูกผลิตขึ้นที่ความเข้มข้น  $35.14 \pm 7.53$  กรัมต่อลิตร และ  $65.01 \pm 0.64$  กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลอง ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้ออีโคไล KJ122-pKJSUC น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิต กรดซักซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อยที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

SITHA CHAN : PRODUCTION OF SUCCINIC ACID FROM SUCROSE AND  
SUGARCANE MOLASSES BY METABOLIC ENGINEERED *ESCHERICHIA*  
*COLI*. THESIS ADVISOR : KAEMWICH JANTAMA, Ph.D., 90 PP.

SUCCINATE/ *ESCHERICHIA COLI*/ ANAEROBIC CONDITIONS/ SUCROSE/  
SUGARCANE MOLASSES

*Escherichia coli* KJ122 was engineered to produce high titer and yield of succinate in mineral salt medium containing glucose under simple-batch anaerobic conditions. However, this strain does not efficiently utilize sucrose due to catabolic repression. To enhance the sucrose utilization of KJ122, sucrose utilizing genes (*cscA* and *cscKB*) containing their native promoters from *E. coli* B, which is able to naturally utilize sucrose, were cloned and functionally expressed in KJ122. The transformants harboring a recombinant plasmid named pKJSUC were selected for the efficient sucrose utilization on the phenol red agar and broth supplemented with sucrose. The clones exhibited a larger clear yellow zone on the agar compared to KJ122 without the plasmid, and showed a high ability in fast growth and acid production in cultivation broth. After performing metabolic evolution, KJ122-pKJSUC efficiently consumed sucrose to produce high succinate concentration with less accumulation of by-products in AM1 medium. The optimal concentration of sucrose at 70 g/L could produce succinate at  $50.52 \pm 1.80$  g/L (productivity at 1.05 g/L/h) in 500 mL small anaerobic bottles and at  $46.59 \pm 1.23$  g/L (productivity at 0.97 g/L/h) in 10 L bioreactor within 48 hours. In addition, it was found that antibiotics had no effects on succinate production by KJ122-pKJSUC under batch conditions. Succinate at concentration of  $47.69 \pm 3.94$  g/L (productivity at 0.99 g/L/h) was produced from 150 g/L molasses in a small anaerobic bottle after 48 hours. In 10 L bioreactor, succinate at concentration of  $35.14 \pm 7.53$  g/L (0.73 g/L/h) and  $65.01 \pm 0.64$  g/L (0.67 g/L/h) was

produced within 48 hours and 96 hours, respectively. These results demonstrated that KJ122-pKJSUC would be a potential strain for the economic bio-based succinate production from sucrose and sugar cane molasses.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature\_\_\_\_\_

Advisor's Signature\_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_